

ẢNH HƯỞNG CỦA THỨC ĂN CÓ BỔ SUNG CHITOSAN LÊN MỘT SỐ CHỈ TIÊU MIỄN DỊCH KHÔNG ĐẶC HIỆU Ở CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Bùi Thị Bích Hằng* và Nguyễn Hoàng Vũ

Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm bài viết: Bùi Thị Bích Hằng (email: btbhang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/03/2019

Ngày nhận bài sửa: 24/05/2019

Ngày duyệt đăng: 31/10/2019

Title:

Effect of dietary chitosan on non-specific immune parameters of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Từ khóa:

Cá tra, chất kích thích miễn dịch, chitosan, kháng khuẩn

Keywords:

Bacterial resistance, catfish, chitosan, immunostimulants

ABSTRACT

The study of supplemented chitosan in feed of striped catfish is aimed to evaluate the effect of chitosan on some non-specific immune parameters of this catfish. The experiment was randomly designed with three replication of four treatments (0, 1, 5 and 10 g/kg of feed), triplication for each treatment. Blood samples were collected in week 2 and 4 after chitosan administration. Then, fish were challenged with *Edwardsiella ictaluri*. The effect of chitosan on immune response was evaluated through: (i) hematological parameters including total red blood cells, total white blood cells, monocyte, neutrophil, lymphocyte and thrombocyte and lysozyme activity in fish serum; (ii) mortality rate of fish after infection with the *E. ictaluri* bacterium. The results showed that hematological parameters, lysozyme and complement activity of supplemented chitosan treatments were significantly higher than control in both sampling times. After challenge with *E. ictaluri*, the mortality of fish in supplemented chitosan treatments was lower than the control treatment (60%). Treatment supplemented 1 g chitosan/kg feed displayed the lowest mortality (40%). The results revealed that supplemented chitosan at level 1 g/kg feed can stimulate the immune response of striped catfish and increase the bacterial resistance of fish.

TÓM TẮT

Nghiên cứu bổ sung chitosan vào thức ăn cá tra nhằm đánh giá khả năng ảnh hưởng của chitosan lên một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu của cá tra. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức (0, 1, 5, 10 g/kg thức ăn), ba lần lặp lại. Tiến hành thu mẫu sau 2 và 4 tuần cho cá ăn thức ăn có bổ sung chitosan. Sau đó, tiến hành cảm nhiễm cá thí nghiệm với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Hiệu quả của chitosan tác động lên đáp ứng miễn dịch của cá được đánh giá thông qua: (i) các chỉ tiêu huyết học và miễn dịch bao gồm mật độ tế bào hồng cầu, tổng bạch cầu, tế bào bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, lympho và tiểu cầu; hoạt tính của lysozyme trong huyết thanh cá; (ii) tỉ lệ chết của cá sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*. Kết quả nghiên cứu cho thấy chỉ tiêu huyết học hoạt tính lysozyme của cá ở các nghiệm thức được bổ sung chitosan tăng cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ở các lần thu mẫu. Sau khi cảm nhiễm với *E. ictaluri*, tỉ lệ chết của cá ở các nghiệm thức có bổ sung chitosan thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng (60%), nghiệm thức bổ sung 1 g chitosan/kg thức ăn có tỉ lệ chết thấp nhất (40%). Kết quả nghiên cứu cho thấy bổ sung chitosan ở mức 1 g/kg thức ăn làm tăng khả năng đáp ứng miễn dịch cá tra và tăng khả năng kháng vi khuẩn ở cá.

Trích dẫn: Bùi Thị Bích Hằng và Nguyễn Hoàng Vũ, 2019. Ảnh hưởng của thức ăn có bổ sung chitosan lên một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(5B): 33-41.

1 GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, nghề nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) đã và đang có những đóng góp to lớn vào tỷ trọng xuất khẩu của ngành thủy sản Việt Nam nói chung và ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) nói riêng. Tuy nhiên, sự tăng nhanh về diện tích nuôi và mức độ thâm canh hóa cá tra ngày càng cao là nguyên nhân dẫn đến nhiều loại bệnh truyền nhiễm thường xuyên xảy ra và gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho nghề nuôi cá tra công nghiệp ở ĐBSCL (Từ Thanh Dung và *ctv*, 2010). Những bệnh phổ biến xảy ra trên cá tra như: xuất huyết, phù mắt, trắng gan, trắng mang... Đặc biệt, bệnh gan thận mù do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* là tác nhân chính gây bệnh trên cá tra (*P. hypophthalmus*) đã làm tăng tỉ lệ chết của cá, chi phí điều trị và gây thiệt hại lớn cho người nuôi (Ferguson *et al.*, 2001). Việc sử dụng thuốc kháng sinh để kiểm soát mầm bệnh, nhất là đối với các mô hình nuôi thâm canh mật độ cao là rất phổ biến. Tuy nhiên, sử dụng quá nhiều loại thuốc kháng sinh trong phòng và trị bệnh trên thủy sản làm xuất hiện hiện tượng kháng thuốc kháng sinh ở các loài vi khuẩn trong thực tế là không thể tránh khỏi (Cabello, 2006; Từ Thanh Dung và *ctv*, 2010). Hiện nay, nhằm hạn chế việc sử dụng thuốc kháng sinh và đảm bảo an toàn thực phẩm, rất nhiều nhà khoa học đã quan tâm và tìm ra các giải pháp tích cực nhằm tăng cường sức đề kháng của vật nuôi. Sử dụng chất kích thích miễn dịch là một trong những giải pháp được nhiều người hướng đến bởi nhiều lợi ích mang lại của giải pháp này. Chitosan là một chất có hoạt tính kháng ký sinh trùng, kháng khuẩn, có khả năng kích thích miễn dịch và tự phân hủy sinh học cao, không gây dị ứng, không gây độc hại cho người và vật nuôi và thường được sử dụng như nguồn được liệu quý trong nuôi thủy sản (Polk *et al.*, 1994). Ngoài ra, một số nghiên cứu bổ sung chitosan vào thức ăn làm tăng miễn dịch của cá hồi (Meshkini *et al.*, 2012), cá chép (Aathi *et al.*, 2013), đồng thời nghiên cứu của Maqsood *et al.* (2010) còn chỉ ra việc bổ sung 2% chitosan vào thức ăn có thể làm giảm tỉ lệ chết của cá chép khi cảm nhiễm với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá tác động chitosan lên đáp ứng miễn dịch ở cá tra cũng như khả năng phòng vệ của cá tra đối với tác nhân vi khuẩn gây bệnh gan thận mù.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Bố trí thí nghiệm bổ sung chitosan

Cá tra giống khỏe có kích cỡ 10 - 15 g/cá được chuyển về phòng thực nghiệm Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ và thuần dưỡng trong 2 tuần để cá thích nghi với điều

kiện thí nghiệm. Trước khi bố trí thí nghiệm, 5 cá được kiểm tra lâm sàng ngẫu nhiên về hình dạng, ký sinh trùng và vi khuẩn.

Thí nghiệm bổ sung chitosan (Sigma) vào thức ăn được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên lặp lại ba lần với bốn nghiệm thức: NT1 (đối chứng - 0 g chitosan/kg thức ăn), NT2 (1 g chitosan/kg thức ăn), NT3 (5 g chitosan/kg thức ăn) và NT4 (10 g chitosan/kg thức ăn), mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mỗi bể (250 L) có hệ thống sục khí được bố trí 60 cá. Cá được cho ăn 2 lần/ngày với khẩu phần 5% trọng lượng thân trong vòng 4 tuần. Tiến hành thu mẫu ở tuần thứ 2 và tuần thứ 4 sau khi cá được cho ăn thức ăn có bổ sung chitosan. Mỗi lần thu mẫu máu của 15 cá/nghiệm thức để phân tích các chỉ tiêu huyết học, hoạt tính lysozyme và bổ thể.

2.2 Thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*

Vi khuẩn *E. ictaluri* được nuôi tăng sinh trong môi trường Nutrient Broth, ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 610 nm. Nguồn vi khuẩn này được sử dụng để cảm nhiễm cho cá trong thí nghiệm tiếp theo.

Sau 4 tuần cho ăn thức ăn có bổ sung chitosan, cá được tiến hành cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức, bao gồm 1 nghiệm thức đối chứng (tiêm 0,1 mL nước muối sinh lý) và 4 nghiệm thức bổ sung chitosan 0, 1, 5, 10 g được tiêm vi khuẩn *E. ictaluri*, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Mỗi bể bố trí 10 cá. Trong thời gian cảm nhiễm, cá được cho ăn bằng thức ăn công nghiệp theo nhu cầu. Thí nghiệm cảm nhiễm được thực hiện bằng phương pháp tiêm vi khuẩn với mật độ 10^5 CFU/mL, liều lượng 0,1 mL/cá (Hang *et al.*, 2013). Theo dõi cá trong 2 tuần, ghi nhận những biểu hiện bệnh lý và số lượng cá chết. Mẫu thận trước của cá lờ đờ được thu và trữ trong ethanol để tái định danh vi khuẩn.

2.3 Các chỉ tiêu miễn dịch

Định lượng hồng cầu được thực hiện theo phương pháp của Natt and Herrick (1952), mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm Neubauer và tính theo công thức: $HC = C \times 10 \times 5 \times 200$ (tb/mm³), (C: Tổng số hồng cầu trong 5 vùng đếm).

Định lượng tổng bạch cầu và từng loại bạch cầu được thực hiện theo phương pháp của Hrubec *et al.* (2000). Trãi mẫu máu bằng cách nhỏ một giọt máu lên lame, sau đó dùng lamelle chạm vào giọt máu và đẩy lamelle ngược về phía trước. Mẫu máu sau khi khô được cố định trong methanol 1 phút. Để mẫu khô tự nhiên và nhuộm Wright & Giemsa. Tổng số lượng bạch cầu được tính theo công thức:

TBC (tb/mm³) = (Số BC trong 1.500 tế bào × R)/Số HC trong 1.500 tế bào, (TBC: mật độ tổng bạch cầu, BC: bạch cầu, R: mật độ hồng cầu, HC: hồng cầu).

Định lượng từng loại bạch cầu trong tổng số 200 tế bào bạch cầu. Tính mật độ từng loại bạch cầu theo công thức: Mật độ loại bạch cầu (tb/mm³) = (Số lượng mỗi loại bạch cầu × TBC)/200.

Xác định hoạt tính lysozyme được phân tích theo phương pháp của Ellis *et al.* (1990). Dụng đường chuẩn lysozyme với các nồng độ 0, 2, 4, 8 và 16 µg/mL. Cho 10 µL dung dịch từ các nồng độ pha loãng cho vào đĩa 96 giếng, tiếp theo cho 200 µL/giếng dịch huyền phù *Micrococcus luteus* (Sigma). Đối với mẫu huyết thanh của cá, cho 10 µL vào đĩa 96 giếng, thêm 200 µL/giếng vi khuẩn *M. luteus*. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 27°C và đo ở bước sóng 495 nm. Hoạt tính lysozyme được tính dựa vào đường chuẩn lysozyme.

2.4 Quy trình PCR phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri*

Vi khuẩn *E. ictaluri* được phát hiện dựa theo qui trình PCR được mô tả bởi Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương (2009). Mẫu hiện vạch 407 bp là mẫu dương tính với *E. ictaluri*.

2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được nhập, tính trung bình bằng phần mềm Excel. Các số liệu được xử lý thống kê ANOVA 1 nhân tố với mức ý nghĩa 5% bằng phần mềm SPSS.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả chỉ tiêu huyết học

Mật độ hồng cầu: Sau 2 tuần bổ sung chitosan, mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức có bổ sung chitosan dao động từ 1,84 – 2,15 × 10⁶ tb/mm³. Chi NT2 (1 g chitosan/kg) có mật độ hồng cầu (2,15 ± 0,24 × 10⁶ tb/mm³) tăng cao hơn so với nghiệm thức

đối chứng (1,87 ± 0,19 × 10⁶ tb/mm³), trong khi các nghiệm thức NT3 và NT4 đều có mật độ hồng cầu thấp hơn đối chứng, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (p>0,05) (Bảng 1). Sau 4 tuần bổ sung chitosan, mật độ hồng cầu (HC) dao động trong khoảng 2,05 -2,27 × 10⁶ tb/mm³ và tăng cao có ý nghĩa thống kê ở tất cả các nghiệm thức được bổ sung chitosan so với nghiệm thức đối chứng (1,92 × 10⁶ tb/mm³) (p<0,05). Trong đó, NT 2 (1 g chitosan/kg) cho kết quả mật độ hồng cầu tăng cao nhất (2,27 x 10⁶ tb/mm³), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Ngoài ra, mật độ hồng cầu của các nghiệm thức bổ sung chitosan ở lần thu mẫu thứ 2 (sau 4 tuần) cũng tăng cao có ý nghĩa thống kê so với lần thứ 1 (sau 2 tuần) (p<0,05).

Hồng cầu có chức năng tham gia vào quá trình vận chuyển oxy và các thành phần trong tế bào máu đến các cơ quan và các tế bào, tuy không tham gia trực tiếp vào quá trình đáp ứng miễn dịch, nhưng cũng góp phần gián tiếp ảnh hưởng đến hệ miễn dịch của tôm, cá (Chinabut *et al.*, 1991). Kết quả thí nghiệm này cho thấy bổ sung chitosan vào thức ăn làm gia tăng tế bào hồng cầu ở cá. Nghiên cứu trước đây cũng đã ghi nhận sự gia tăng mật độ hồng cầu và trị số hematocrite của cá trôi (*Cirrhina mrigala*) khi bổ sung 1% chitin và chitosan vào thức ăn (Mari *et al.*, 2014). Một nghiên cứu khác, bổ sung chitosan dạng nano (0, 1, 3 và 5 g/kg) vào thức ăn cho cá rô phi trong 70 ngày, kết quả cho thấy mật độ hồng cầu của cá được bổ sung nano chitosan tăng cao hơn so với cá nhóm đối chứng (p<0,05). Cá được bổ sung 5 g chitosan có mật độ hồng cầu tăng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác (p<0,05). Ngoài ra, hàm lượng hemoglobin của cá ở nhóm bổ sung 3 và 5 g chitosan tăng cao và khác biệt thống kê với cá đối chứng (p<0,05) (El-Naby *et al.*, 2019).

Bảng 1: Mật độ tổng hồng cầu (x10⁶ tb/mm³) và tổng bạch cầu (x10³ tb/mm³) của cá tra ở tuần 2 và tuần 4 sau khi ăn thức ăn bổ sung chitosan

Nghiệm Thức	Hồng cầu (x10 ⁶ tb/mm ³)		Tổng bạch cầu (x10 ³ tb/mm ³)	
	2 tuần	4 tuần	2 tuần	4 tuần
NT 1 (0 g/kg)	1,87 ± 0,19 ^{Aa}	1,92 ± 0,06 ^{Ca}	306,2 ± 39,5 ^{Aa}	302,2 ± 10,4 ^{Ca}
NT 2 (1 g/kg)	2,15 ± 0, 24 ^{Ab}	2,27 ± 0, 07 ^{Aa}	376,6 ± 60,7 ^{Aa}	373,8 ± 10,8 ^{Aa}
NT 3 (5 g/kg)	1,86 ± 0,11 ^{Ab}	2,05 ± 0,12 ^{Ba}	319,4 ± 17,3 ^{Aa}	321,6 ± 9,6 ^{Ba}
NT 4 (10 g/kg)	1,84 ± 0,21 ^{Ab}	2,08 ± 0,09 ^{Ba}	316,2 ± 13,2 ^{Aa}	326,0 ± 6,5 ^{Ba}

Giá trị thể hiện là số trung bình ± độ lệch chuẩn. Các số liệu cùng nằm trên một cột (A, B, C, D) và một hàng (a, b, c, d) trong cùng một chỉ tiêu có chữ số giống nhau thì sai khác không có ý nghĩa thống kê (p>0,05).

Tổng bạch cầu: Tương tự, mật độ tổng bạch cầu ở các nghiệm thức có bổ sung chitosan dao động trong khoảng 316,2 – 373,8 x 10³ tb/mm³ và tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (306,2 x 10³ tb/mm³), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý

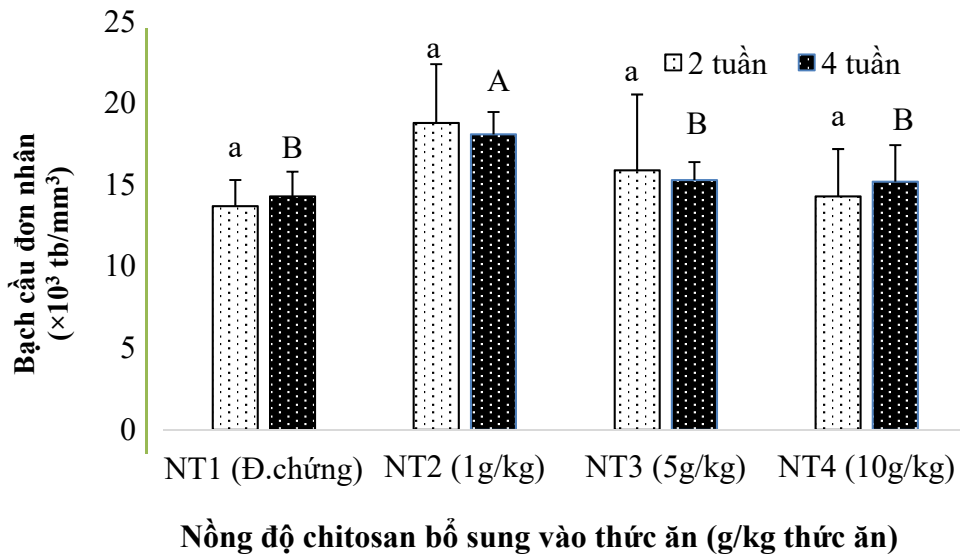
nghĩa thống kê sau 2 tuần bổ sung chitosan (p>0,05) (Bảng 1). Sau 4 tuần, mật độ tổng bạch cầu của cá được bổ sung chitosan tăng cao có ý nghĩa thống kê so với cá đối chứng. Đặc biệt, cá được bổ sung 1 g chitosan có tổng bạch cầu cao nhất (373,8 x 10³

tb/mm³) và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Ngoài ra, tổng bạch cầu của cá được bổ sung chitosan trong 4 tuần cao hơn so với cá bổ sung 2 tuần, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Chỉ tiêu huyết học là một công cụ quan trọng trong việc đánh giá tình trạng sinh lý và sức khỏe của động vật bao gồm cá. Thông thường, các tế bào máu được kiểm tra nhằm phản ánh những ảnh hưởng của các chất kích thích miễn dịch lên hệ miễn dịch cá (Maita *et al.*, 2007). Nghiên cứu của El-Naby *et al.* (2019) cũng đã chỉ rõ, tổng bạch cầu của cá được bổ sung chitosan dạng nano cũng tăng cao hơn so với cá đối chứng, tuy nhiên chỉ có nghiệm thức bổ sung 5 g/kg cho kết quả tăng cao nhất và có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Nghiên cứu bổ sung 1% chitin và chitosan vào thức ăn ở cá mú cho thấy tổng bạch cầu của nhóm cá được bổ sung

chitin và chitosan tăng cao hơn cá ở nhóm đối chứng từ tuần thứ 1 sau khi được bổ sung và tiếp tục tăng cao ở tuần thứ 2, thứ 3 (Harikrishnan *et al.*, 2012a, b).

Bạch cầu đơn nhân: Sau 2 tuần bổ sung chitosan, mật độ các loại tế bào bạch cầu đơn nhân (BCĐN) của cá ở các nghiệm thức bổ sung chitosan tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng ($14,3-18,8 \times 10^3$ tb/mm³), trong đó nghiệm thức bổ sung 1% chitosan có mật độ bạch cầu đơn nhân cao nhất ($18,8 \times 10^3$ tb/mm³), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($13,7 \times 10^3$ tb/mm³) ($p > 0,05$) (Hình 1). Tương tự ở tuần 4, các nghiệm thức được bổ sung chitosan có mật độ tế bào đơn nhân cao hơn ở nghiệm thức đối chứng. Đặc biệt, mật độ bạch cầu đơn nhân của nghiệm thức bổ sung 1% cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác ($p < 0,05$).

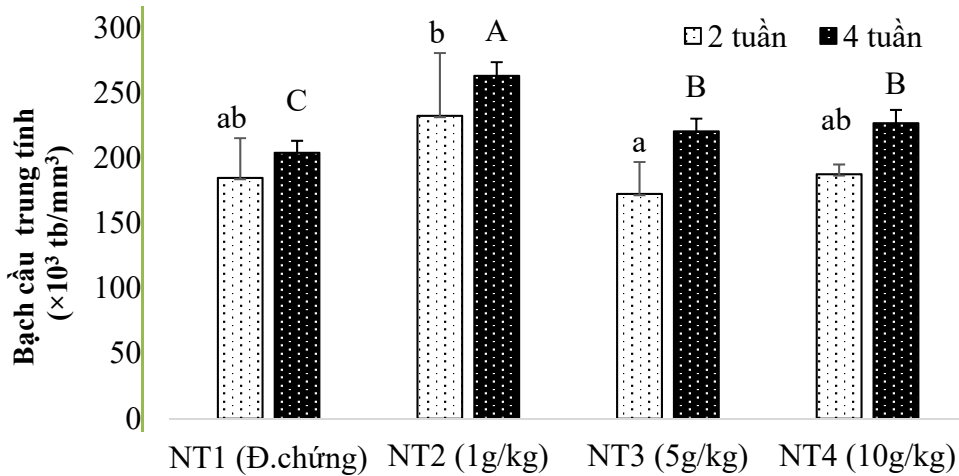


Hình 1: Mật độ bạch cầu đơn nhân của cá tra sau khi bổ sung chitosan

Các giá trị cùng mang mẫu tự (A, B) hay (a, b) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bạch cầu trung tính: Sau khi bổ sung chitosan, mật độ bạch cầu trung tính của cá được bổ sung đều tăng cao hơn cá ở nghiệm thức đối chứng trong cả hai lần thu mẫu (Hình 2). Ở lần thu mẫu thứ 2 (4 tuần), sự gia tăng bạch cầu trung tính của cá ở các nghiệm thức bổ sung chitosan có ý nghĩa thống kê

so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Riêng nghiệm thức bổ sung 1 g/kg chitosan, có mật độ bạch cầu trung tính cao nhất ($263,3 \times 10^3$ tb/mm³), khác biệt thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$).



Nồng độ chitosan bổ sung vào thức ăn (g/kg thức ăn)

Hình 2: Mật độ bạch cầu trung tính của cá tra sau khi bổ sung chitosan

Các giá trị cùng mang mẫu tự (A, B) hay (a, b) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Tế bào lympho: Mật độ tế bào lympho ở các nghiệm thức có bổ sung chitosan đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng trong cả 2 lần thu mẫu, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Bảng 2). Bên cạnh đó, mật độ lympho ở lần thu mẫu 2 đều tăng cao hơn so với lần thu mẫu 1 ở tất cả các nghiệm thức.

Tiểu cầu: Tương tự, mật độ tế bào tiểu cầu dao động từ $13,4 - 22,8 \times 10^3$ tb/mm³ (Bảng 2), cụ thể NT2

($22,8 \times 10^3$ tb/mm³), NT3 ($22,7 \times 10^3$ tb/mm³) và NT4 ($16,9 \times 10^3$ tb/mm³) đều cao hơn NT1 (đối chứng) ($13,4 \times 10^3$ tb/mm³), tuy nhiên chỉ có nghiệm thức NT2 và NT3 là khác biệt có ý nghĩa thống kê với đối chứng. Sau 4 tuần bổ sung chitosan, mật độ tiểu cầu giảm nhiều so với lần thu mẫu đầu tiên, chỉ có nghiệm thức NT2 (1 g/kg thức ăn) có mật độ tiểu cầu cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$).

Bảng 2: Mật độ bạch cầu lympho, tiểu cầu của cá tra sau khi bổ sung chitosan

Nghiệm Thức	Lympho ($\times 10^3$ tb/mm ³)		Tiểu cầu ($\times 10^3$ tb/mm ³)	
	2 tuần	4 tuần	2 tuần	4 tuần
NT 1 (đối chứng)	80,3 ± 5,4	94,3 ± 27,4	13,4 ± 3,27 ^{Ba}	3,27 ± 0,58 ^{Bb}
NT 2 (1 g/kg)	87,5 ± 3,7	109,5 ± 15,1	22,8 ± 4,0 ^{Aa}	4,98 ± 0,95 ^{Ab}
NT 3 (5 g/kg)	82,5 ± 5,7	108,2 ± 15,7	22,7 ± 6,09 ^{Aa}	3,22 ± 0,96 ^{Bb}
NT 4 (10 g/kg)	80,7 ± 7,1	97,3 ± 7,1	16,9 ± 0,6 ^{ABa}	3,25 ± 0,98 ^{Bb}

Giá trị thể hiện là số trung bình ± độ lệch chuẩn. Các số liệu cùng nằm trên một cột (A, B, C, D) và một hàng (a, b, c, d) trong cùng một chỉ tiêu có chữ số giống nhau thì sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bạch cầu tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch của vật chủ chống lại các tác nhân gây hại. Tuy nhiên, tùy vào từng loại bạch cầu mà đảm nhiệm các chức năng khác nhau (Chinabut *et al.*, 1991). Kết quả thí nghiệm này cũng phù hợp với một số nghiên cứu về chitosan trước đây. Nghiên cứu của Mari *et al.* (2014) bổ sung hàm lượng 1% chitosan vào thức ăn cá trôi (*Cirrhinus mrigala*) trong 4 tuần. Kết quả cho thấy các chỉ tiêu huyết học bao gồm bạch cầu, tế bào lympho, bạch cầu trung tính và hoạt tính lysozyme trong huyết thanh đều tăng đáng kể so với nghiệm thức đối chứng từ tuần 1 – 4. Tuy nhiên, hệ số huyết sắc tố (hemoglobin) và tế bào tiểu cầu bắt đầu tăng đáng kể ở tuần 2 và 4. Ranjan *et al.* (2014) đã nghiên cứu bổ sung chitosan với các hàm lượng

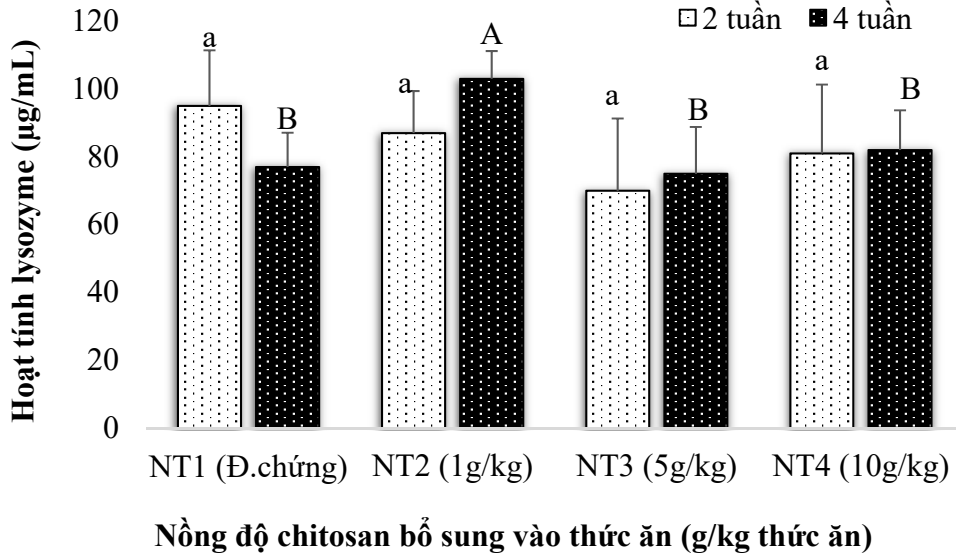
0, 5, 10, 20 g/kg thức ăn cá chêm trong 60 ngày. Kết quả cũng cho thấy các chỉ tiêu huyết học ở các nghiệm thức được bổ sung chitosan tăng đáng kể và khác biệt có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Một nghiên cứu khác bổ sung 2% chitin và chitosan vào khẩu phần ăn cá mú, thu mẫu ở tuần 1, 2, 4 và 3 ngày sau khi cảm nhiễm với *Vibrio alginolyticus*. Kết quả cho thấy, ở các nghiệm thức có bổ sung chitin và chitosan có số lượng các tế bào bạch cầu tăng đáng kể so với nghiệm thức đối chứng. Tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính tăng lên đáng kể ở các nghiệm thức có bổ sung chitosan so với các nghiệm thức còn lại (Harikrishnan *et al.*, 2012a). Tương tự, Harikrishnan *et al.* (2012b) tiếp tục bổ sung 1% chitosan vào chế

độ ăn cá mú để phòng bệnh ký sinh trùng. Kết quả cho thấy mật độ hồng cầu, bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân và tế bào lympho ở các nghiệm thức bổ sung chitosan tăng lên đáng kể so với nghiệm thức đối chứng.

3.2 Kết quả hoạt tính lysozyme và bổ thể

Sau 2 tuần bổ sung chitosan, hoạt tính lysozyme

trong huyết thanh cá có sự biến động chênh lệch dao động từ 70 - 95 µg/mL, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) giữa các NT có bổ sung chitosan với NT đối chứng. Sau 4 tuần cho ăn, hoạt tính lysozyme trong huyết thanh của cá ở các nghiệm thức được bổ sung chitosan đều tăng cao hơn so với lần thu mẫu đợt 1. Tuy nhiên, NT2 có hoạt tính lysozyme cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các NT còn lại ($p < 0,05$).



Hình 3: Hoạt tính lysozyme trung bình của các nghiệm thức sau khi cho ăn 2 tuần và 4 tuần (µg/mL)

Các giá trị cùng mang mẫu tự (A, B) hay (a, b) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh là một trong các chỉ tiêu quan trọng trong việc đánh giá đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của động vật. Kết quả thí nghiệm này cho thấy hoạt tính lysozyme của cá được bổ sung chitosan tăng lên, hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Harikrishnan *et al.* (2012a) đã bổ sung 2% chitin và chitosan vào khẩu phần ăn cá mú trong 4 tuần. Kết quả cho thấy hoạt tính lysozyme trong huyết thanh của cá được bổ sung 2% chitin và chitosan tăng cao hơn đáng kể so với cá đối chứng. Một thí nghiệm khác đã bổ sung β -1,3 glucan, chitosan và raffinose vào khẩu phần ăn cá chép Koi (*Cyprinus carpio*) trong 8 tuần. Thu mẫu ở ngày thứ 7, 14, 21 và 56 để đánh giá đáp ứng miễn dịch. Kết quả cho thấy β -1,3 glucan kích thích gia tăng hoạt tính lysozyme, hoạt tính NBT, khả năng chống oxy hóa thông qua chỉ tiêu superoxide dismutase của cá ở các nghiệm thức bổ sung chitosan và raffinose và được duy trì cho đến ngày thứ 56 (Lin *et al.*, 2011). Gopalakannan *et al.* (2006) khi nghiên cứu bổ sung chitosan vào thức ăn cho cá chép trong thời gian 90 ngày cho thấy hoạt tính lysozyme tăng có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ở mức $p < 0,001$. Ngoài ra, Shibata (1997) cho biết chitosan và chitin thường được sử dụng như một

chất kích thích miễn dịch trên gia súc, gia cầm. Thí nghiệm trên chuột cho thấy chitosan, chitin làm gia tăng các chỉ tiêu miễn dịch thể dịch như bạch cầu, lysozyme, hoạt tính đại thực bào, đồng thời biểu hiện một số cytokine liên quan đến đáp ứng miễn dịch như các IL-12, yếu tố hoại tử khối u (TNF α) và IL8, làm gia tăng sản xuất yếu tố INF γ của các tế bào tiêu diệt tự nhiên NK (natural killer).

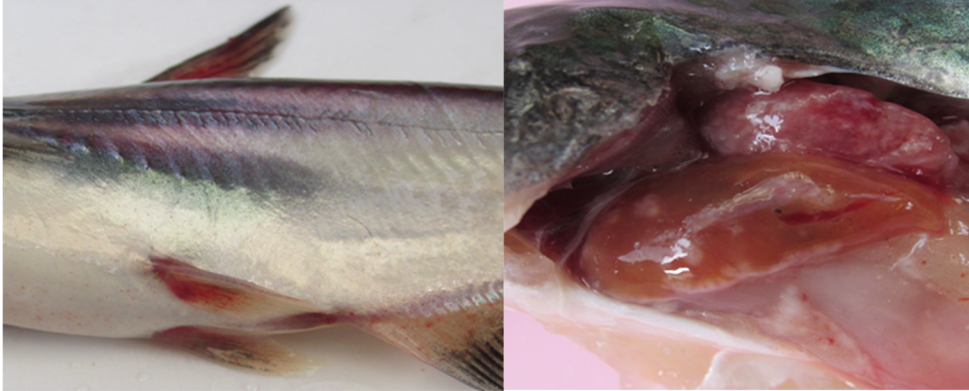
3.2.1 Khả năng kháng vi khuẩn E. ictaluri của chitosan

Sau 14 ngày theo dõi thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, kết quả cho thấy cá sau khi cảm nhiễm có dấu hiệu bơi lơ đờ, kém ăn, không phản ứng với tiếng động và một số vảy cá có dấu hiệu tưa rách, xuất huyết. Khi giải phẫu bên trong nội quan thường có dịch trong xoang bụng và có mùi hôi; gan thận và tỳ tạng xuất hiện nhiều đốm trắng nhỏ li ti (Hình 4). Dấu hiệu bệnh lý của cá tra sau khi cảm nhiễm với *E. ictaluri* cho thấy hoàn toàn giống như mô tả dấu hiệu bệnh gan thận mù trên cá tra của Đặng Thụy Mai Thy (2010).

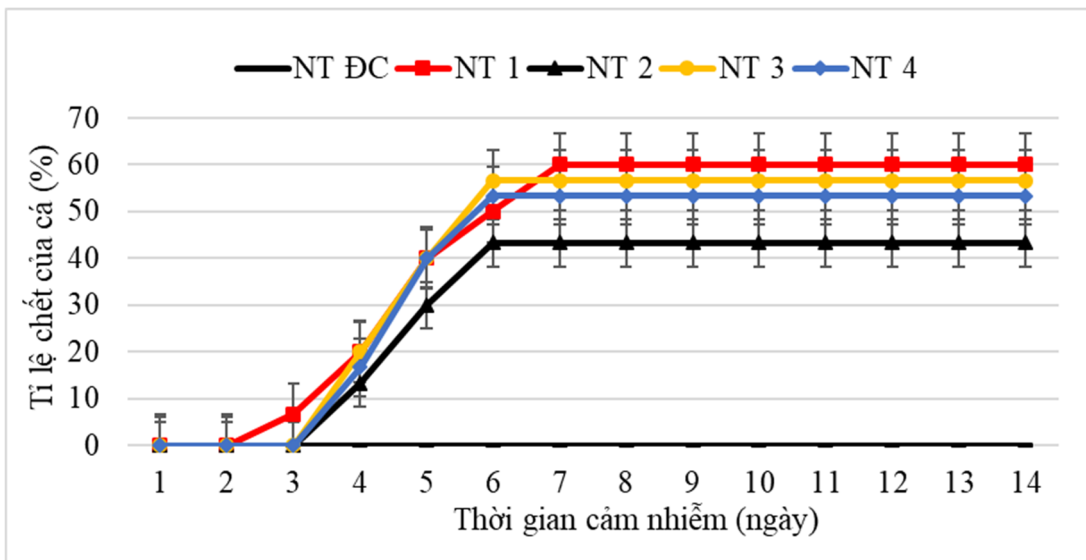
Trong 2 ngày đầu sau khi tiêm vi khuẩn gây cảm nhiễm, cá ở tất cả các nghiệm thức đều bình thường,

đến ngày thứ 3 nghiệm thức không bổ sung chitosan bắt đầu có cá chết. Cá ở các nghiệm thức có bổ sung chitosan bắt đầu chết vào ngày thứ 4 sau khi cảm nhiễm, các cá còn lại ở các nghiệm thức có dấu hiệu bơi lờ đờ và bơi tập trung ở các nơi sục khí. Sau 14 ngày thí nghiệm, tỷ lệ chết của cá ở nghiệm thức không bổ sung chitosan có tỷ lệ chết cao nhất, đạt

60%; nghiệm thức NT2 (1 g/kg thức ăn) có tỷ lệ chết thấp nhất là 43,3%. Trong khi đó, nghiệm thức NT3 và NT4 có tỷ lệ chết lần lượt là 56,6% và 53%. Nghiệm thức đối chứng âm (NTĐC) tiêm nước muối sinh lý, cá hoạt động bình thường và không chết.



Hình 4: Cá tra thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* (mũi tên: xuất huyết vây và đốm trắng li ti trên gan, thận)



Hình 5: Biểu đồ tỷ lệ chết tích lũy của cá tra ở các nghiệm thức bổ sung chitosan khi cảm nhiễm với *E. ictaluri* sau 14 ngày

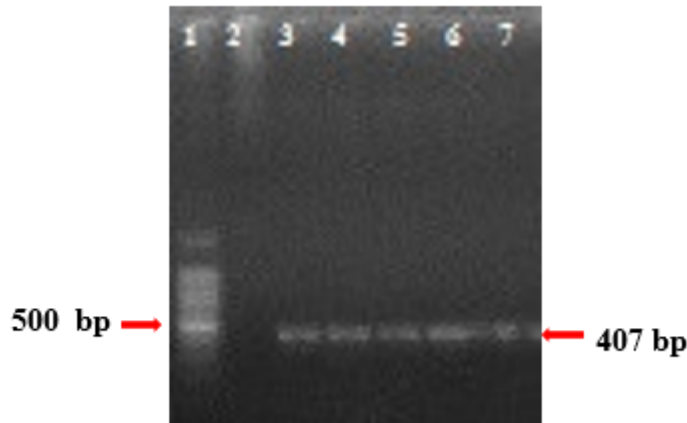
Trong nghiên cứu này, tỷ lệ chết của cá sau cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ thấp nhất ở nghiệm thức NT2. Điều này hoàn toàn phù hợp với các kết quả kiểm tra huyết học và hoạt tính lysozyme của cá tra thí nghiệm. Cá được bổ sung chitosan có đáp ứng miễn dịch tốt nhất ở nghiệm thức NT2 (1 g/kg thức ăn) thể hiện qua việc kích thích sản sinh tổng bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, tiểu cầu và hoạt tính lysozyme. Tương tự, Mari *et al.* (2014) thí nghiệm bổ sung 1% chitosan vào thức ăn cá trôi (*Cirrhinus mrigala*), sau đó cảm nhiễm cá thí nghiệm với

Aphanomyces invadans. Kết quả cho thấy các chỉ tiêu huyết học, hoạt tính thực bào, hoạt tính lysozyme và bổ thể đều tăng cao ở các nghiệm thức bổ sung chitosan. Tỷ lệ chết của cá ở nghiệm thức có bổ sung 1% chitosan là 10% thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng (25%). Thí nghiệm bổ sung chitosan với các hàm lượng 0, 5, 10, 20 g/kg thức ăn cá chêm và gây cảm nhiễm với *Vibrio anguillarum*. Kết quả cũng ghi nhận nghiệm thức bổ sung 10 g chitosan/kg thức ăn có tỉ lệ chết thấp nhất là 25% (Ranjan *et al.*, 2014). Nghiên cứu của Lin *et al.* (2012) đã kết hợp chitosan với *Bacillus coagulans* trộn vào thức ăn cá

chép Koi (*Cyprinus carpio Koi*) và cho cá ăn trong 8 tuần, sau đó cảm nhiễm cá thí nghiệm với vi khuẩn *Aeromonas veronii*. Kết quả cho thấy nghiệm thức kết hợp bổ sung chitosan và *B. coagulans* thể hiện khả năng đề kháng với vi khuẩn *A. veronii* ở mức cao, có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức bổ sung chitosan và *B. coagulans* đơn và khả năng đề kháng thấp nhất là nhóm đối chứng. Một số nghiên cứu của Harikrishnan et al. (2012a) và Lin et al.

(2012) đều cho thấy cá được bổ sung chitosan thì có tỷ lệ chết thấp hơn khi cảm nhiễm với tác nhân gây bệnh so với nghiệm thức đối chứng.

Kết quả tái định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR trên mẫu thận của cá tra có biểu hiện bệnh cho thấy các mẫu đều thể hiện vạch đặc hiệu của *E. ictaluri* ở 407 bp.



Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm PCR tái định danh vi khuẩn *E. ictaluri*

Giếng 1: thang đo DNA; Giếng 2: đối chứng âm; Giếng 3: đối chứng dương; Giếng 4: NT1; Giếng 5: NT2; Giếng 6: NT3; Giếng 7: NT4.

4 KẾT LUẬN

Cá tra được ăn thức ăn có bổ sung chitosan trong 4 tuần cho thấy có sự kích thích đáp ứng miễn dịch thông qua việc gia tăng một số chỉ tiêu tế bào huyết học như mật độ tổng bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, ... và hoạt tính lysozyme trong huyết thanh của cá. Sau cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, tỉ lệ chết của cá được bổ sung chitosan giảm đáng kể. Như vậy, từ kết quả thí nghiệm cho phép kết luận bổ sung chitosan vào thức ăn sẽ kích thích đáp ứng miễn dịch của cá, đồng thời có thể phòng vệ cho cá tra chống lại tác nhân gây bệnh gan thận mũ. Nên bổ sung chitosan vào thức ăn cá ở liều 1% sẽ mang lại hiệu quả kích thích miễn dịch và phòng bệnh gan thận mũ cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aathi, K., Ramasubramanian V., Uthayakumar V., and Munirasu S., 2013. Effect of chitosan supplemented diet on survival, growth, hematological, biochemical and immunological responses of Indian major carp *Labeo rohita*. International Research Journal of Pharmacy 4(5): 141 – 147.

Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the

environment. Environmental Microbiology 8(7): 1137–1144.

Chinabut, S., Kisawat P. and Limsuwan C., 1991. Histology of the walking catfish, *Clarias batrachus*. International development research center, Canada, 96 pages.

Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2009. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng phương pháp PCR. Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ 13: 151-159.

Đặng Thụy Mai Thy, 2010. Nghiên cứu đặc tính gây bệnh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Luận văn cao học. Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ. 83 trang.

Ellis, A.E., 1990. Lysozyme activity. In: T.C. Stolen, P.D. Fletcher, B.S. Anderson, B.S. Roberson, W.B. Muiswinkel (editors). Technique in Fish Immunology. New York: SOS Publications, pp 101-103.

El-Naby, F.S. A., Naiel, M.A.E., Al-Sagheer A.A., Negm, S.S., 2019. Dietary chitosan nanoparticles enhance the growth, production performance, and immunity in *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 501: 82–89.

Ferguson, H.W., Turnbull, J. F., Shinn, A., Thompson, K., Dung, T.T., and Crumlish, M., 2001. Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) from the Mekong

- Delta, Viet Nam. Journal of Fish Diseases 24: 509-513.
- Gopalakannan, A. and Arul V., 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture* 255:179-187.
- Hang, B.T.B., Milla S., Gillardin V., Phuong N.T. and Kestemont P., 2013. *In vivo* effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on regulation of immune response and protein expression in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish and Shellfish Immunology* 34 (1): 339-347.
- Harikrishnan, R., Kim, J-S., Balasundaram, C. and Heo, M-S., 2012a. Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus* infection. *Aquaculture* 326: 46–52.
- Harikrishnan, R., Kim, J-S., Balasundaram, C. and Heo, M-S., 2012b. Dietary supplementation with chitin and chitosan on haematology and innate immune response in *Epinephelus bruneus* against *Philasterides dicentrarchi*. *Experimental Parasitology* 131: 116–124.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J. L., and Smith, S. A., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured *Tilapia (Oreochromis hybrid)*. *Veterinary Clinical Pathology* 29: 7-12.
- Lin, S., Pan, Y., Luo, L. and Luo, L., 2011. Effects of dietary β -1,3-Glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of Koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish & Shellfish Immunology* 32:788 – 794.
- Lin, S., Guan, S., Lou, L. and Pan, Y., 2012. Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of Koi (*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*, 31: 36 -41.
- Maita, M., 2007. Fish health assessment. In: Dietary supplements for the health and quality of cultured fish, Nakagawa, H., Sato, M., Gatlin III, D.M. (Eds.), pp 10 – 571 34. CAB International. Oxon, UK.
- Maqsood, S., Singh, P., Samoon, M. H., Balange, A. K., 2010. Effect of dietary chitosan on non-specific immune response and growth of *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *International Aquatic Research* 2: 77-85.
- Mari, L. S. S., Jagruthi, C., Anbazahan, S. M., *et al.*, 2014. Protective effect of chitin and chitosan enriched diets on immunity and disease resistance in *Crrihina Mrigala* against *Aphanomyces Invadans*. *Fish and Shellfish Immunology* 39(2): 378-385.
- Meshkini, S., Taky, A-A., Tukmechi, A., Farhang-Pajuh, F., 2012. Effects of chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Research Forum* 3: 49-55.
- Natt, M. P., Herrick, C. A., 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poult Sci.* 31:735 – 738.
- Polk, A. E., Amsden, B., Scarratt D.J., Gonzal, A., Augustine O., Okhamafed, Mattheus F.A. Goosen, 1994. Oral delivery in Aquaculture: controlled release of proteins from chitosan-alginate microcapsules. *Aquaculture Engineering* 13: 311 – 323.
- Ranjan, R., Prasad, K. P., Vani, T. and Kumar R., 2014. Effect of dietary chitosan on haematology, innate immunity and disease resistance of Asian seabass *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture Research* 45: 983–993.
- Shibata, Y., Metzger, J.W. and Myrvik, Q. N., 1997. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL12 production. *Journal of Immunology* 159 (5): 2462– 2467.
- Từ Thanh Dung, Nguyễn Anh Tuấn, Sorgeloos, P., Decostere, M., Haesebrouck, F., 2010. Hiện trạng kháng thuốc kháng sinh trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan, thận mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ* 15a:162-171.